



Fachgerechte und tierschutzkonforme Antikörperproduktion in Kaninchen, Hühnern und Labornagetieren

Inhaltsverzeichnis	Seite
A Zielsetzung und Geltungsbereich	2
B Rechtsgrundlagen und Bewilligungsgrundsätze	2
C Grundsätze für das tierschonende Immunisieren	3
1 Immunologische Grundlagen	3
2 Wahl der Tierart	3
3 Immunisierung	4
31 Antigene	4
32 Verwendung von Adjuvantien	5
33 Vertretbare Injektionsvolumina pro Injektionsstelle	6
34 Injektionsmethoden	6
35 Boosterinjektionen und Blutentnahmen	8
4 Überwachung der immunisierten Tiere	8
D Ausgewählte Adjuvantien	8
1 Grundsätze bei der Verwendung von komplettem Freund'schem Adjuvans	8
2 Alternative Adjuvantien	9
E Antikörpergewinnung aus dem Hühnerei (Refinementverfahren)	11
F Ascitesmethode (unzulässige Methode)	11
G Empfohlene Literatur	12

A Zielsetzung und Geltungsbereich

Antikörper werden als Hilfsmittel und Reagentien für biochemische, molekularbiologische und immunhistochemische Verfahren hergestellt, sowie zu diagnostischen und therapeutischen Zwecken verwendet. Ihre Herstellung ist, je nach verwendeter Methode, mit unterschiedlich stark ausgeprägten Entzündungsreaktionen beim Tier verbunden. Die Richtlinie zeigt Möglichkeiten auf, die Belastung von Tieren bei der Antikörpergewinnung zu vermindern (**Refinement**).

Die Richtlinie bezieht sich hauptsächlich auf die Herstellung **polyklonaler Antikörper**. Sie ist sinngemäss auch für die vorgängige Immunisierung von Mäusen und anderen Labornagetieren für die in vitro-Produktion monoklonaler Antikörper anzuwenden. Auf präventive Immunisierungen (Impfungen) oder die Produktion von Immunseren (biologischen Produkten) wird in dieser Richtlinie nicht eingegangen.

Die Richtlinie richtet sich an alle Personen, die Immunisierungen zur Antikörperproduktion durchführen, veranlassen oder beaufsichtigen (**Forschende, Laborpersonal, Versuchsleitende, Tierschutzbeauftragte**). Sie richtet sich des weiteren an die **Bewilligungsbehörden und ihre beratenden Kommissionen**.

B Rechtsgrundlagen und Bewilligungsgrundsätze

Die Gewinnung von Antikörpern ist ein **bewilligungspflichtiger Tierversuch**, bei dessen Durchführung einem Tier **Schmerzen, Leiden oder Schäden** nur zugefügt werden dürfen, soweit dies für den verfolgten Zweck **unvermeidlich** ist (vgl. Art. 12, 14 Bst. b und 16 Abs. 1 Tierschutzgesetz vom 9. März 1978, TSchG, SR 455 und Art. 60 Abs. 2 Bst. a und e, sowie 61 Abs. 1 Bst. b Tierschutzverordnung vom 27. Mai 1981, TSchV, SR 455.1).

Bewilligungspflichtige Tierversuche dürfen nur unter der Leitung einer erfahrenen Fachperson von Personen durchgeführt werden, die über die hierfür notwendigen **Fachkenntnisse und die erforderliche praktische Ausbildung** verfügen (vgl. Verordnung vom 12. Oktober 1998 über die Aus- und Weiterbildung des Fachpersonals für Tierversuche, SR455.171.2, sowie Art. 15 Abs. 2 TSchG und 59d TSchV).

Erforderlich sind namentlich genaue Kenntnisse über

- das unterschiedliche Entzündungspotential der Adjuvantien an sich, sowie in Abhängigkeit der Injektionsmethoden und des –volumens
- die verschiedenen Belastungsgrade der einzelnen Injektionsmethoden
- die tierschutzkonformen Blutentnahmetechniken und zulässigen –volumina bei den verschiedenen Tierarten gemäss BVET-Information 800.116-3.02
- die unerwünschten Nebenwirkungen der verwendeten Antigen/Adjuvanskombinationen.

Durch Studium der Fachliteratur oder mittels anderer, geeigneter Methoden ist das Wissen stets auf dem

neuesten Stand zu halten und Alternativmethoden im Sinne der 3R Beachtung zu schenken.

Die Bewilligungsbehörde ist gehalten, allenfalls mittels **Auflage** sicherzustellen, dass nur tierschonende Verfahren zur Anwendung kommen und dass diese von Personen mit der hierfür verlangten Fachkenntnis gemäss dieser Richtlinie durchgeführt werden (vgl. Verordnung vom 12. Oktober 1998 über die Aus- und Weiterbildung des Fachpersonals für Tierversuche, SR455.171.2, sowie Art. 61a Abs.3 Bst. c TSchV).

C Grundsätze für das tierschonende Immunisieren

1 Immunologische Grundlagen

Bei der Herstellung von Antikörpern wird die natürliche Abwehrreaktion des Körpers gegenüber immunogenen Fremdmolekülen ausreichender Grösse (Antigenen) ausgenutzt: Eindringene, fremde Organismen, Toxine, aber auch abgestorbene, körpereigene Zellen werden in einem komplexen, kontrollierten Zusammenspiel von Zellen und Mediatoren bekämpft (Neutralisation/Elimination). Wesentliche Schritte dabei sind der **Transport** des Antigens via Lymphe oder Blut vom Eintrittsort zu den spezifischen Abwehrzellen in Lymphknoten und Milz, die **Antigenpräsentation** durch Makrophagen, dendritische Zellen, T-Helferzellen und endlich die **Aktivierung von Antigen-spezifischen Abwehrzellen** und ihre Transformation zu Antikörper-produzierenden Plasmazellen (humorale Antwort) und/oder zu zytotoxischen T-Zellen (zellvermittelte Antwort), sowie zu Gedächtniszellen (Memory B-Zellen) in Milz und Lymphknoten.

Erneuter Kontakt mit dem gleichen Antigen führt zur rascher auftretenden und stärker ausfallenden Sekundärantwort. Plasmazellen überleben nur Tage bis Wochen, weshalb sie durch **Reaktivierung von Gedächtniszellen** dauernd ersetzt werden müssen.

2 Wahl der Tierart

Entsprechend den mit der Antikörperproduktion im Zusammenhang stehenden Eingriffen am Tier sind bei der Wahl der Tierart folgende Faktoren zu berücksichtigen: Umgänglichkeit, Stressanfälligkeit, Applikationsmöglichkeiten, sowie, je nach benötigter Serummenge, Zugang zu den Blutgefässen, bzw. das Gesamtblutvolumen. Ferner spielen der genetische Hintergrund, die phylogenetische Distanz zur Herkunftsspezies, sowie der zu produzierende Antikörpertyp eine entscheidende Rolle.

Den artspezifischen **Haltungsanforderungen** (Gruppenhaltung für sozial lebende Arten, Gehegestrukturierung, Beschäftigung) ist in jedem Fall Rechnung zu tragen.

Kriterien zur Wahl der Tierart

Tierart	Serumgewinnung ¹	Haltungsanforderungen
Kaninchen	einfach	Gruppenhaltung, Nagemöglichkeit
Huhn	entfällt	Paarhaltung, Nest, Sitzstange, Einstreu
Maus	nur präterminal	Gruppenhaltung, Beschäftigung
Ratte	nur präterminal	Gruppenhaltung, Beschäftigung
Meerschweinchen	präterminal, ev. einmal Herzpunktion	Gruppenhaltung, Nagemöglichkeit

¹ vgl. BVET-Information 800.116-3.02

Die beste Antikörperausbeute wird mit jungen Adulten erzielt. Sehr junge Tiere sind noch nicht voll immunkompetent, weshalb für die einzelnen Tierarten das folgende **Alter** bei der Erstimmunisierung empfohlen wird:

Kaninchen: 3 Monate
Huhn: 5 Monate
Maus: 6 Wochen
Ratte: 6 Wochen
Meerschweinchen: 3 Monate

3 Immunisierung

Für routinemässig durchgeführte Immunisierungen ist das optimale Immunisierungsschema (gute Antikörperproduktion bei minimaler Belastung für das Tier) für jede verwendete Tierart und Antigen/Adjuvanskombination durch **Pilotstudien** zu ermitteln. Dies gilt nicht für einzelne Immunisierungen, bei denen die Belastung der Tiere unter Berücksichtigung gewisser Punkte dennoch vermindert werden kann. Die folgenden Abschnitte weisen auf diese Möglichkeiten hin.

31 Antigene

Gute **Immunogene** erzeugen hohe Antikörpertiter, Antikörper von hoher Affinität (Bindungsstärke) und ein immunologisches Gedächtnis. Korpuskuläre Antigene wie ganze Bakterien oder Zellen, aber auch Zellwandfraktionen erzielen in der Regel auch ohne Adjuvansverwendung die gewünschte Wirkung. Dagegen sind Adjuvantien meist nötig, wenn mit nativen oder löslichen Antigenen (Proteine, Peptide, Polysaccharide) immunisiert wird, ebenso wenn das Antigen nur in sehr begrenzter Menge vorliegt.

Um die Bildung von Antikörpern hervorzurufen, muss das Antigen in einem für jedes Antigen charakteristischen Konzentrationsbereich vorliegen (ca. 10 µg – 1 mg, **Fenster der Immunogenität**). Ausserhalb dieses Bereichs bleibt die Antikörperbildung aus (Unterdrückung der Immunantwort, Toleranz), was beim Festsetzen der Antigenosis zu berücksichtigen ist.

Die **Sterilität des Inoculums** ist sowohl für den Erfolg der Immunisierung als auch zur Belastungsverminderung des Versuchstiers von grosser Bedeutung. Deshalb muss bei der Antigenzubereitung eine Kontamination mit Keimen, fremden Agenzien, deren Bestandteilen oder mit Nebenprodukten (toxische Lösungsmittel, aus Gels extrahierte Antigene) vermieden werden. Je reiner das Antigen, desto höher die Spezifität der Antikörper und, in der Regel, desto geringer die Nebenwirkungen der Immunisierung. Deshalb wird empfohlen, die Antigenlösung vor der Injektion auf Sterilität zu prüfen und allenfalls zu dekontaminieren (Filtration) oder zu verwerfen.

32 Verwendung von Adjuvantien

Adjuvantien sind Hilfsstoffe verschiedenster Zusammensetzung zur Verstärkung und/oder Verlängerung einer Immunantwort. Sie wirken sich aus auf Titerhöhe und -verlauf, Avidität und Typ der Immunantwort (humoral oder zellvermittelt, Typ des Antikörpers). Verschiedene **Wirkungsmechanismen** sind bekannt: Depotbildung (Schutz des Antigens vor Abbau und seine kontinuierliche Freisetzung), Verbesserung der Antigenpräsentation durch Konzentration/Aggregation des Antigens (Surfactants, darunter Stabilisatoren, Vehikel, Carrier), Unterstützung des Antigentransports zu den Abwehrzentren (Vehikel), Entzündungsförderung (Bakterien, Endotoxine, Lipid A, Bakterienderivate, gewisse Surfactants).

Adjuvantien können in Abhängigkeit des Antigens, der Tierart, der Injektionsstelle und des -volumens unterschiedlich schwere **Nebenwirkungen** hervorrufen wie Granulome, Abszesse und Fisteln, Ulcera, Nekrosen, Peritonitiden oder tödliche Embolien. Deshalb ist die Notwendigkeit der **Adjuvantienverwendung sorgfältig abzuwägen** und auf das nötige Minimum zu beschränken. Müssen Adjuvantien verwendet werden, sind diejenigen mit der geringsten Belastung zu wählen.

Entzündungspotential verschiedener Adjuvantienbestandteile:

Adjuvantienbestandteile		Entzündungspotential	Beispiele von Adjuvantien mit den entsprechenden Bestandteilen
Bakterien synthetische Derivate	Mykobakterien	+++	FCA ¹
	MDP ²	++	SAF ³ , Gerbu
	TDM ⁴	+	RIBI
	MPL ⁵	-	RIBI
Öle	Mineralöl	++	FA ⁶ , Specol, Montanide
	Squalen, Squalan	+	Titermax, SAF, Montanide
Saponine	Quil A	++(+)	
	ISCOMs ⁷ mit Quil A	-	ISCOMs ⁷
Aluminiumsalze		(+)	Alhydrogel

¹ komplettes Freund'sches Adjuvans

² Muramyl-dipeptid

³ Syntex Adjuvant Formulation

⁴ Trehalose Dimycolat

⁵ Monophosphoryl Lipid A

⁶ Freund's Adjuvans

⁷ immunestimulating complexes

33 Vertretbare Injektionsvolumina pro Injektionsstelle (maximal 4 subcutane oder intradermale Depots)

Antigenlösung mit Adjuvans

	subcutan	intradermal	intramuskulär	intraperitoneal	intravenös	Pfote
Kaninchen	0,25 ml	(0,025 ml)	-	-	-	-
Huhn	0,5 ml	-	(0,5 ml)	-	-	-
Maus	0,1 ml	-	-	(0,2 ml)	-	-
Ratte	0,2 ml	-	-	(0,2 ml)	-	-
Meerschweinchen	0,2 ml	-	-	-	-	-

Antigenlösung ohne Adjuvans

	subcutan	intradermal	intramuskulär	intraperitoneal	intravenös	Pfote
Kaninchen	1,5 ml	(0,05 ml)	-	(10 ml)	(5 ml)	-
Huhn	4 ml	-	0,5 ml	(10 ml)	(0,5* ml)	-
Maus	0,5 ml	-	-	1 ml	-	(0,05 ml)
Ratte	1 ml	-	-	5 ml	(0,5 ml)	(0,1 ml)
Meerschweinchen	1 ml	-	-	(5 ml)	-	-

* 0,5 ml pro kg Körpergewicht; () Injektionsmethode zu begründen; - Injektionsmethode für diese Tierarten abzulehnen.

34 Injektionsmethoden

Effizient sind Injektionsmethoden, die zur raschen und weiten Verbreitung des Antigens in Lymphknoten und Milz führen. Die Wahl der Methode hängt von der Tierart, vom Adjuvans und der Art und Menge des Antigens ab. Von den möglichen Applikationsformen ist die für das Tier am wenigsten belastende zu wählen.

Für die Injektionen sind scharfe, **sterile Einmalkanülen** zu verwenden. Folgende Kanülengrößen werden empfohlen:

	sc	id	im	ip	iv
Kaninchen	Ø 0,9 mm	(Ø 0,45 mm)	-	(Ø 0,8 mm)	(Ø max. 0,9 mm)
Huhn	Ø 0,6 mm	-	Ø max. 0,8 mm	(Ø 0,8 mm)	(Ø 0,6 mm)
Maus	Ø max. 0,5 mm	-	-	Ø max. 0,6 mm	-
Ratte	Ø max. 0,6 mm	-	-	Ø 0,6 mm	(Ø max. 0,5 mm)
Meerschweinchen	Ø max. 0,9 mm	-	-	(Ø 0,6 mm)	-

- Injektionsmethode für diese Tierart abzulehnen; () Injektionsmethode zu begründen.

Besonders für ölige Lösungen wird empfohlen, langsam und subcutan zu injizieren.

multiple Injektionen	Grosse Injektionsvolumina (schlecht konzentrierbare Antigene) sind auf maximal vier subcutane oder intradermale, weit auseinander liegende Depots zu verteilen. Inocula mit stark reizenden Adjuvantien sind auf maximal vier subcutane Depots zu verteilen.
subcutan (sc)	Methode der Wahl für alle Tierarten. Geringe Belastung, gute Verteilung des Antigens.
intradermal (id), intracutan	Antigen gelangt rasch in die Lymphknoten. Belastung mittel- bis hochgradig (Druckdolenz, Ulcera bei Verwendung gewisser Adjuvantien wie FCA). In begründeten Fällen (kleine Antigenmengen) vertretbar für Kaninchen, geübtes Personal vorausgesetzt.
intramuskulär (im)	Kleine Antigene gelangen rasch über Blut und Lymphe in die Abwehrorgane. Belastung mittel- bis hochgradig (Verwendung öligler Adjuvantien, akzidentelle Ausbreitung mit Nervenschädigung). Abzulehnen bei Nagetieren wegen der geringen Muskelmasse und bei Kaninchen, da die subcutane Injektion eine weniger belastende Alternative darstellt. Für Hühner geeignet (m. pectoralis), ausser mit stark reizenden Adjuvantien.
intraperitoneal (ip)	Weite und rasche Antigenverbreitung, weshalb bei Boosterinjektionen die Gefahr eines anaphylaktischen Schocks besteht. Für Mäuse und Ratten vertretbar, sofern keine stark reizenden Adjuvantien (mittel- bis hochgradige Belastung) verwendet werden und lösliche Antigene nur einmal über diese Route injiziert werden. Vor der Injektion reizender Lösungen sind die Tiere vorgängig zu sedieren .
intravenös (iv)	Nur in gut begründeten Einzelfällen (kleine, partikuläre Antigene). Unzulässig für grössere und lösliche Antigene, sowie für die meisten Adjuvantien wegen Embolie- und Anaphylaxiegefahr.
Injektion in Pfote	Nur in gut begründeten Einzelfällen (z. B. kleinste Antigenmengen) bei Ratten und Mäusen unter folgenden Bedingungen vertretbar: keine Verwendung reizender Adjuvantien, Injektion dorsal und nur einseitig in eine Hinterpfote, Tiere vorgängig sediert , geübtes Personal vorausgesetzt, Haltung auf weicher Einstreu, nicht zur Erzeugung polyklonaler Antikörper.
Injektionen direkt in die Milz oder Lymphknoten	Nur in gut begründeten, unerlässlichen Einzelfällen (z. B. kleinste Antigenmengen) unter folgenden Bedingungen: keine Verwendung von Adjuvantien, keine Boosterinjektionen mit diesen Methoden, Eingriff unter Allgemeinanästhesie , nicht zur Erzeugung polyklonaler Antikörper.

35 Boosterinjektionen und Blutentnahmen

Zur Stimulation der Gedächtniszellen braucht es weniger Antigen als für die Erstimmunisierung und die **subcutane Methode** bringt in der Regel die gewünschten Resultate. Unzulässig wegen Anaphylaxiegefahr sind intravenöse oder intraperitoneale Boosterinjektionen löslicher Antigene.

Boosterinjektionen sind ohne oder allenfalls mit belastungsarmen **Adjuvantien** vorzunehmen, da diese einerseits bei wiederholter Verabreichung ausgeprägtere Nebenwirkungen als bei der Erstimmunisierung verursachen und andererseits ihr Einsatz zum Erzielen guter Antikörpertiter nicht immer notwendig ist.

In der Regel sind selten mehr als **zwei Boosterinjektionen** angebracht, um eine gute Antikörperproduktion zu erhalten. Der Zeitpunkt der Zweit- und Folgeinjektionen hat sich nach dem Antikörper-Titerverlauf zu richten, da zu frühes oder zu häufiges Boostern eher eine Immunsuppression bewirkt und die Tiere unnötig belastet. Bei Verwendung depotbildender Adjuvantien ist in der Regel ein **Intervall von mindestens 4 Wochen** bis zum Boostern angezeigt.

Für **Blutentnahmen** sind hinsichtlich Technik und Entnahmeholumina die Bestimmungen der BVET-Information 800.116-3.02 einzuhalten. Für allfällige Serumtitertbestimmungen ist den Hühnern Blut aus der Flügelvene zu entnehmen.

4 Überwachung der immunisierten Tiere

Verschiedene, v.a. bakterielle Produkte oder Öle enthaltende Adjuvantien verursachen teils schwere, chronische **Entzündungsreaktionen** (vgl. p. 5, Ziff. 32). Deshalb sind die Tiere und besonders die Injektionsstellen nach der Immunisierung **täglich zu kontrollieren** und Veränderungen unter Angabe des Schweregrades zu protokollieren (vgl. BVET-Information 800.116-1.05). Dabei ist zu beachten, dass schwere Läsionen erst nach Wochen auftreten, Wundsekrete subcutan von dorsal nach ventral migrieren können. Tiere mit Veränderungen sind adäquat zu **therapieren**.

D Ausgewählte Adjuvantien

1 Grundsätze bei der Verwendung von komplettem Freund'schem Adjuvans

Komplettes Freund'sches Adjuvans (FCA) ist für viele Antigene ein sehr effizientes Adjuvans. Allerdings treten gelegentlich schwere Gewebeschädigungen auf, die v.a. während der ersten Tage mit mehr oder weniger ausgeprägten klinischen Symptomen wie Schwellungen, Gewichtsverlust und Bewegungsunlust einhergehen.

Unter den zahlreichen, modernen Adjuvantien lässt sich für viele Antigene ein für die verwendete Tierart geeignetes, weniger belastendes Adjuvans finden (Vergleichsstudien, Literaturstudium). Wo dies nicht

der Fall ist, gelten für die Verwendung von FCA folgende **Einschränkungen**:

Für **Routine-Immunisierungsprotokolle** darf FCA erst dann eingesetzt werden, wenn **Vorversuche** (Pilotstudien) ergeben haben, dass die zu verwendenden Antigene mit mindestens zwei alternativen Adjuvantien ungenügende Ergebnisse erzielt haben, und es dürfen mit FCA in der Regel keine schweren klinischen und pathologischen Belastungssymptome auftreten.

Für **einzelne Immunisierungen** ist die Verwendung von FCA vertretbar, wenn in der Literatur für den gleichen Antigentyp bei der selben Tierart keine Erfolge mit alternativen Adjuvantien beschrieben wurden und folgende **Bedingungen** eingehalten werden:

- Es wird **subcutan** injiziert, beim Huhn ausnahmsweise intramuskulär, jedoch ist die subcutane Route zu bevorzugen (Verschieblichkeit von Abszessen).
- **Injektionsstellen**, wo Automutilation möglich ist oder die beim Handling der Tiere angefasst werden müssen, werden möglichst vermieden.
- Das **Injektionsvolumen** ist klein oder wird auf maximal vier **subcutane**, weit auseinander liegende Depots verteilt (vgl. Seite 6, Kapitel 33).
- Für die **Boosterinjektionen** ist ein belastungsarmes Adjuvans vorzusehen.

Unzulässig sind:

- **Zweit- und Folgeinjektionen** von FCA wegen Anaphylaxiegefahr.
- **Intraperitoneale** Injektionen wegen Peritonitisgefahr.
- **Intradermale** Injektionen wegen Ulceragefahr.
- **Intravenöse Injektionen** wegen Emboliegefahr.
- Injektionen in **Pfoten, Lymphknoten** oder **Milz**.

2 Alternative Adjuvantien

Die Zusammensetzungen der modernen, alternativen Adjuvantien werden von den Herstellerfirmen laufend hinsichtlich Belastungsgrad und Titerausbeute verbessert. Folglich sind die unten aufgeführten Kommentare als generelle Hinweise zu verstehen. Die Gesuchsteller sind gehalten, sich über neue Zusammensetzungen bekannter Adjuvantien sowie neu eingeführte Produkte auf dem laufenden zu halten.

21 Specol

Specol enthält Mineralöl, wird aber dennoch v.a. von Kaninchen viel besser vertragen als FCA. Specol führt mit verschiedenen Antigenen zu guten bis sehr guten Titern, ausgenommen mit sehr hydrophoben Antigenen oder Autoantigenen. Specol wird bei Kaninchen (subcutan), Mäusen (subcutan) und Hühnern (subcutan, intramuskulär) erfolgreich verwendet.

22 Montanide ISA Adjuvantien (ISA = Incomplete Seppic Adjuvant)

Die Montanide ISA Adjuvantien enthalten unterschiedliche Anteile an teils metabolisierbaren Ölen und Surfactants. Subcutan an Kaninchen, Mäuse oder Meerschweinchen verabreichtes Montanide ISA 740 wird allgemein gut vertragen. Andere Montanide Adjuvantien werden tierartlich unterschiedlich, aber in

der Regel viel besser als FCA vertragen. Mit verschiedenen Antigenen ergeben sie gute bis sehr gute Titer.

23 Ribi's Adjuvant System RAS

Ribi's ist für verschiedene Tierarten in unterschiedlicher Zusammensetzung erhältlich. Es enthält modifizierte Bakterienderivate und metabolisierbares Öl. Ribi's wird allgemein gut vertragen, obschon mit gewissen Antigenen v.a. bei Kaninchen starke Entzündungsreaktionen auftreten können. Subcutan verabreicht erzielt es v.a. mit Protein- und Polypeptidantigenen nach häufigem Boostern gute Titer in Mäusen, Kaninchen und Hühnern.

24 Gerbu

Gerbu enthält ein Detergens und GMDP, welches eine Verbindung zwischen dem synthetischen Bakterienderivat MDP und Glucosamin, einer immunologisch aktiven Komponente von Lactobacillen, darstellt. Gerbu wird im allgemeinen gut vertragen, so auch vom Huhn nach subcutaner oder intramuskulärer Verabreichung. Neuere Formulierungen mit niedrigem GMDP-Gehalt erzeugen in Ratten und Mäusen mit verschiedenen Antigenen in der Regel sehr gute Titer. Da Gerbu keinen Depoteffekt hat, muss für eine gute Titerausbeute häufig geboostert werden.

25 ISCOMs (immunestimulating complexes)

ISCOMs bestehen aus Saponin/Cholesterin/Antigen-Micellen, die rasch in die Lymphknoten transportiert werden, wo sie das Antigen präsentieren. ISCOMs werden subcutan oder intramuskulär verabreicht gut vertragen, während sie intraperitoneal verabreicht schwere Läsionen verursachen. Um gute Titer zu erhalten, sind Boosterintervalle von sechs bis acht Wochen einzuhalten. RV-ISCOMs, die an Stelle von viralen Hüllenproteinen Tollwutvirus-Glykoprotein enthalten, erzeugen mit kleinen Antigenen (Peptiden, Autoantigenen) sehr gute Titer. ISCOMs sind nicht kommerziell erhältlich, und ihre Zubereitung ist recht anspruchsvoll.

26 Hunter's Titermax

Titermax enthält metabolisierbares Öl, dennoch treten manchmal schwere Entzündungsreaktionen auf. Mäuse sind besonders anfällig, weshalb es unzulässig ist, ihnen Titermax intraperitoneal zu verabreichen. Kaninchen vertragen Titermax im allgemeinen recht gut. In jedem Fall sind die vom Hersteller empfohlenen Injektionsvolumina, die geringer als die sonst üblichen sind, einzuhalten. Je nach Tierart und Antigen werden sehr unterschiedliche Titer erzielt, wobei die Breite von ungenügend bis sehr gut reicht.

27 Inkomplettes Freund'sches Adjuvans FIA

FIA unterscheidet sich von FCA nur durch das Fehlen von Mykobakterien, weshalb FIA weniger ausgeprägte Nebenwirkungen erzeugt. FIA wird v.a. zum Boostern nach FCA-Injektion verwendet, kann aber auch für Erstimmunisierungen eingesetzt werden, wobei allerdings kleinere Titer als nach FCA-

Injektion erzeugt werden. FIA stimuliert ausschliesslich die humorale Antwort.

28 Syntex Adjuvant Formulation SAF

SAF ist ein Vehikeladjuvans und erzielt v.a. mit Proteinen mit hydrophober Gruppe und mit viralen Antigenen eine gute humorale wie zellvermittelte Antwort. Nach subcutaner oder intramuskulärer Injektion treten in der Regel nur geringe Nebenwirkungen auf.

29 Alhydrogel Al(OH)_3

Aluminiumsalze eignen sich für Proteinantigene und sind wenig belastend, weshalb sie in Impfstoffen verwendet werden. Für die Antikörperproduktion sind sie jedoch nicht immer genügend effizient. Sie werden subcutan oder intramuskulär verabreicht. Mehrfaches Boostern ist nötig, wobei auf das Adjuvans manchmal verzichtet werden kann.

30 poly(A).poly(U) (Polyadenyl-polyuridyl Säure)

Es handelt sich um einen synthetischen Doppelstrang-RNA-Komplex mit immunmodulierender und antitumorale Wirkung, der nebst humoraler v.a. zellvermittelte Antwort hervorruft. Dennoch wird bei guter Verträglichkeit (auch intraperitoneal in Mäusen) eine gute Antikörperausbeute erzielt.

E Antikörpergewinnung aus dem Hühnerei (Refinementverfahren)

Die Gewinnung von Antikörpern aus dem Eidotter vorgängig immunisierter Hühner stellt eine belastungsarme Alternative zur herkömmlichen Antikörpergewinnung mittels Blutentnahme dar. Dies setzt allerdings eine **artgerechte Haltung** (vgl. BVET-Richtlinie 800.116-2.04) und ein schonendes Immunisierungsverfahren voraus. **Subcutane Injektionen** sind zu bevorzugen, bei intramuskulären ist auf den Gebrauch reizender Adjuvantien zu verzichten. Nebst Freund'schem Adjuvans (FIA oder FCA) werden Titermax, Specol, Gerbu und Ribis für Hühner verwendet.

F Ascitesverfahren (unzulässige Methode)

Monoklonale Antikörper müssen grundsätzlich durch **in-vitro** Verfahren gewonnen werden. Ausnahmebestimmungen sind in der BVET-Richtlinie 800.116-5.01 festgehalten.

F Empfohlene Literatur

- Verordnung vom 12. Oktober 1998 über die Aus- und Weiterbildung des Fachpersonals für Tierversuche, SR455.171.2.
- BVET-Information 800.116-1.05 vom 14.12.94 über die retrospektive Einteilung von Tierversuchen nach Schweregraden (Belastungskategorien).
- BVET-Information 800.116-3.02 vom 15.08.95 zur Blutentnahme bei Labornagetieren und Kaninchen zu Versuchszwecken.
- BVET-Richtlinie 800.116-2.04 vom 17.01.94 betreffend Käfigabmessungen und -einrichtungen für die Haltung von Haushühnern zu Versuchszwecken.
- BVET-Richtlinie 800.116-3.03 vom 1. Oktober 1996 zur tierschutzkonformen Anästhesie und Analgesie bei Labornagetieren und Kaninchen.
- BVET-Richtlinie 800.116-5.01 vom 20. Mai 1994 zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern.
- ECVAM-Workshop report Nr. 35 1999: The Production of Polyclonal Antibodies in Laboratory Animals. Bezugsquelle: ECVAM, TP580, JRC IHCP, I-21020 Ispra (Va).
- Leenaars PPA, Hendriksen CFM, de Leeuw WA, Carat F, Delahaut P, Fischer R, Halder M, Hanly WC, Hartinger J, Hau J, Lindblad EB, Nicklas W, Outschoorn IM, Stewart-Tull DES 1999: The production of polyclonal antibodies in laboratory animals. The report and recommendations of ECVAM workshop 35. ATLA 27, 79-102.
- AWIC (Animal Welfare Center) 1997: Information Resources for Adjuvants and Antibody Production: Comparisons and Alternative Technologies. U.S. Dep. of Agriculture, National Agricultural Library, AWIC, 10301 Baltimore Avenue, Beltsville, MD 20705, USA; <http://www.nal.usda.gov/awic/pubs/antibody/>
- de Leeuw WA, de Greeve P 1996: Experience with the Dutch Code of Practice for the Immunization of laboratory animals. p. 210-15. In: Forschung ohne Tierversuche 1996, Hrsg. Schöffl, Spielmann, Tritthard et al., Springer Wien.
- Jackson LR, Fox JG 1995: Institutional Policies and Guidelines on Adjuvants and Antibody Production. ILAR Journal 37, 3: 141-52.
- Hanley CW, Artwohl JE, Taylor Bennett B 1995: Review of Polyclonal Antibody Production Procedures in Mammals and Poultry. ILAR Journal 37,3: 93-118.
- Landwehr M 1996: Die tierschutzrechtliche Beurteilung der Immunisierung von Tieren in Deutschland, p.204-9. In: Forschung ohne Tierversuche 1996, Hrsg. Schöffl, Spielmann, Tritthard et al., Springer Wien.
- Amyx HL 1987: Control of animal pain and distress in antibody production and infectious disease studies. JAVMA 191 (10), 1287-9.

Adjuvantien

- Leenaars Marlies 1997: Adjuvants in Laboratory Animals; Evaluation of immunostimulating properties and side effects of Freund's complete adjuvant and alternative adjuvants in immunization procedures. Dissertation Erasmus Universität Rotterdam ISBN: 90-9010685-5. Dr. P.P.A.M. Leenaars, RIVM-CDL, Postfach 1, NL-3720 BA Bilthoven.
- Leenaars M, Hendriksen CFM, Koedam MA, Claassen E 1996: Comparison of alternatives to Freund's Complete Adjuvant, p. 233-41. In: Forschung ohne Tierversuche 1996, Hrsg. Schöffl, Spielmann, Tritthard et al., Springer Wien.
- Leenaars M, Claassen E, Hendriksen CFM 1996: Considering the side-effects of adjuvant products in immunization procedures. Lab Animal 25 (8), 40-3.
- Leenaars PPAM, Hendriksen CFM, Angulo AF, Koedam MA, Claassen E 1994: Evaluation of several adjuvants as alternatives to the use of Freund's adjuvant in rabbits. Veterinary

Immunology and Immunopathology 40, 225-41.

- Leenaars PPAM, Hendriksen CFM, Koedam MA, Claassen I, Claassen E 1995: Comparison of adjuvants for immune potentiating properties and side effects in mice. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 48, 123-38
- Linxweiler W 1996: Effizienz und Verträglichkeit von Adjuvantien bei der Immunisierung von Mäusen, Kaninchen und Schafen, p. 242-8. In: *Forschung ohne Tierversuche 1996*, Hrsg. Schöffl, Spielmann, Tritthard et al., Springer Wien.
- Stewart-Tull DES (Hrsg.) 1995: *The Theory and Practical Application of Adjuvants*. John Wiley & Sons, Chichester. ISBN: 0-471-95170-6.
- Jennings VM 1995: Review of Selected Adjuvants Used in Antibody Production. *ILAR Journal* 37, 3: 119-25.
- Allison AC, Byars NE 1994: Adjuvants. p. 141-51. In: *Antibody Techniques*. Hrsg. Malik VS, Lillehoj EP. Academic Press, San Diego. ISBN: 0-12-466460-1.
- Claassen E, Boersma WJA et al. 1992: 44th Forum in Immunology: Characteristics and practical use of new-generation adjuvants as an acceptable alternative to Freund's complete adjuvant. *Research in Immunology* 143 (5), 471-586.
- Johnson AG 1994: Molecular Adjuvants and Immunomodulators: New Approaches to Immunization. *Clinical Microbiology Reviews* 7 (3), 277-89.
- Johnston BA, Eisen H, Fry D 1991: An Evaluation of Several Adjuvant Emulsion Regimens for the Production of Polyclonal Antisera in Rabbits. *Laboratory Animal Science* 41 (1), 15-21.
- Stills HF, Bailey MQ 1991: The Use of Freund's Complete Adjuvant. *Lab Animal* 20 (4), 25-30.
- Toth LA, Dunlap AW, Olson GA, Hessler JR 1989: An Evaluation of Distress Following Intraperitoneal Immunization with Freund's Adjuvant in Mice. *Laboratory Animal Science* 39 (2), 122-6.
- Kuhlmann I, Storz B, Gast I 1995: Erfahrungen mit dem Einsatz des alternativen Ribi-Adjuvans-Systems zur Gewinnung von Antisera zu Forschungszwecken. *Der Tierschutzbeauftragte* 2, 136-40.
- Sang Jin Park, Won Ho Kim et al. 1995: Adjuvant effect of polyadenylic polyuridylic acid on antibody production of recombinant hepatitis B surface antigen in mice. *Int. J. Immunopharmac.* 17 (6), 513-6.

Antikörpergewinnung aus dem Hühnerei

- Schade R, Staak C, Hendriksen C, Erhard M, Hugl H, Koch G, Larsson A, Pollmann W, van Regenmortel M, Fijke E, Spielmann H, Steinbusch H, Straughan D 1996: The production of Avian (Egg Yolk) Antibodies: IgY. The report and recommendations of ECVAM workshop 21. *ATLA* 24, 925-34.
- Schade R, Hlinak A, Schwarzkopf C et al. 1996: Dottersack-Antikörper, Egg Yolk Antibodies, IgY-Technology. *ALTEX* 13, Supplement 96.
- Schwarzkopf C, Thiele B 1996: Freund's komplettes Adjuvans und mögliche Alternativen zur Gewinnung von IgY: Immunisierungsschemata, Titerentwicklung, Affinitätsreifung und biologische (Un-)Verträglichkeit, p. 254-62. In: *Forschung ohne Tierversuche 1996*, Hrsg. Schöffl, Spielmann, Tritthard et al., Springer Wien.
- Schmidt P, Erhard M, Hofmann A, Schmahl W 1996: Lokale Reaktionen bei Verwendung verschiedener Adjuvantien bei Legehennen. *ALTEX* 13, Supplement 96.
- Schwarzkopf C, Thiele B 1996: Effectivity of Alternative Adjuvants in Comparison to Freund's Complete Adjuvant. *ALTEX* 13, Supplement 96.
- Erhard MH, Hofmann A, Stangassinger M, Löscher U 1996: Lipopeptide als nebenwirkungsfreie Adjuvantien zur Immunisierung von Legehennen. p. 263-7. In: *Forschung ohne Tierversuche 1996*, Hrsg. Schöffl, Spielmann, Tritthard et al., Springer Wien.

